

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. A. Gräßmann

Cytoplasmatische
Progesteron-Rezeptoren in normalem
und neoplastischem Mammagewebe
des Menschen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rainer Sinnecker
aus Berlin

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533901_0008

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. A. Gräßmann

Cytoplasmatische
Progesteron-Rezeptoren in normalem
und neoplastischem Mammagewebe
des Menschen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rainer Sinnecker
aus Berlin

Referent: Privatdozent Dr.med. Kunhard Pollow

Korreferent: Professor Dr.med. Diether Neubert



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 13. September 1976

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Privatdozent Dr. med. Kunhard Pollow,
möchte ich an dieser Stelle für das Über-
lassen des Themas, die Bereitstellung des
Arbeitsplatzes und seine ständige Bereit-
schaft, mich während der Anfertigung die-
ser Arbeit in jeder Form zu unterstützen,
aufrichtigen Dank sagen.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I	A L L G E M E I N E R T E I L	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Eigene Problemstellung	6
II	S P E Z I E L L E R T E I L	7
2	Material und Methoden	7
2.1	Material	7
2.1.1	Steroide	7
2.1.2	Chemikalien	7
2.1.3	Gewebe	8
2.2	Methoden	8
2.2.1	Cytoplasmapräparation	8
2.2.2	Plasma	9
2.2.3	Äquilibriumsdialyse	9
2.2.4	Saccharose-Dichtegradienten- Zentrifugation	10
2.2.5	Agarose-Gelfiltration	11
2.2.6	DEAE-Sephadex-Chromatographie	12
2.2.7	Isoelektrofokussierung	12
2.2.8	Kompetitionsstudien	13
2.2.9	Bestimmung der Proteinkonzentration	13
2.2.10	Radioaktivitätsmessung	13

III	ERGEBNISSE	14
3.1	Charakterisierung der progesteron- bindenden Komponente der Cytoplasma- fraktion von Mammagewebe des Menschen	14
3.1.1	Saccharose-Dichtegradienten- Zentrifugation	14
3.1.2	Agarose-Gelfiltration	17
3.1.3	DEAE-Sephadex-Chromatographie	19
3.1.4	Isoelektrofokussierung	20
3.1.5	Kompetitionsstudien	20
3.1.6	Temperatureinfluß	22
3.1.7	Kinetische Untersuchungen	23
3.2	Bestimmung der Progesteron-Rezep- torkonzentration in normalem und neoplastisch verändertem Brust- drüsengewebe des Menschen	25
IV	DISKUSSION	30
V	ZUSAMMENFASSUNG	39
VI	LITERATUR	41
VII	LEBENS LAUF	48

I A L L G E M E I N E R T E I L

1.1 EINLEITUNG

Die hormonale Regulation molekularer Vorgänge während des Wachstums, der Differenzierung und der sekretorischen Funktion der Brustdrüse des Menschen stellt ein wichtiges Modell für das Studium der vielschichtigen Wechselwirkungen von Hormonen und Targetorganen dar. Die verschiedenen Regulationsprozesse werden durch mannigfaltige hormonale Signale stimuliert: bei den Proteohormonen stehen Prolactin, Insulin und das Somatotropin im Vordergrund. Unter den niedrigmolekularen Steroidhormonen spielen die Östrogene, das Progesteron, das Testosteron und die Corticosteroide eine wichtige Rolle (1).

Tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, daß das Insulin einen starken proliferativen Reiz auf die Epithelzelle der Brustdrüse auszuüben vermag (1-4). Der kombinierte Angriff von Insulin, Hydrocortison und Prolactin stimuliert in der Zellkultur die Casein- und Laktosesynthese (5-7). Östrogene wirken als starke hormonale Stimulatoren auf das Brustdrüsenwachstum (1,8-11), wobei der östrogenbedingte Proliferations-effekt die Mithilfe anderer Hormone erfordert, da er an hypophysektomierten Tieren nicht nachweisbar ist (1). Außerdem ist die Östrogenwirkung auf die Mammapithelzelle konzentrationsabhängig. Bei Konzentrationen niedriger als 10^{-12} M wirkt Östradiol-17 β auf die durch Insulin vermittelte Steigerung der DNS-Syntheserate inhibitorisch, dagegen wirkt eine Kon-

zentration von 10^{-10} M Östradiol zusammen mit Insulin maximal stimulierend (1). Die speziellen Angriffspunkte und Wirkungen von Progesteron, von dem durch Untersuchungen am Endometrium bekannt ist, daß es als physiologischer Gegenspieler der proliferativ wirkenden Östrogene fungiert (12), an der Epithelzelle der Mamma, liegen weitgehend im Dunklen (1). Dennoch scheint dem Progesteron, wie tierexperimentelle Untersuchungen andeuten, oder einem seiner Metabolite, eine wichtige Aufgabe im Rahmen von Wachstum und Funktion der Epithelzelle der Brustdrüse zuzukommen (1, 13-18).

Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Hormone haben gezeigt, daß die Proteohormone (Insulin, Somatotropin, Prolactin) über eine Fixierung an spezifische plasmamembrangebundene Oberflächenrezeptoren der Zelle wirken.

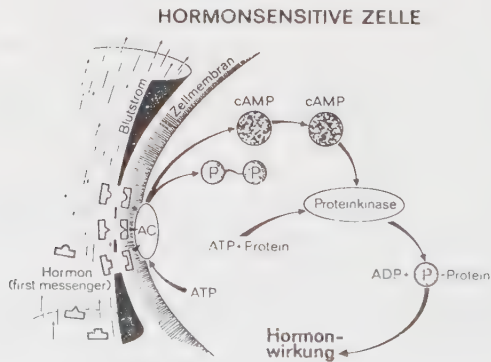


Abb. 1

Wirkungsmechanismus der Proteohormone.

Durch diese Kopplung der Hormone an die Plasmamembranrezeptoren wird auf die benachbart angeordnete membrangebundene Adenylzyklase ein aktivierender oder inhibitorischer Effekt ausgeübt. Die Adenylzyklase hat als Enzym die Aufgabe, aus energiereichem ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat zyklisches AMP zu bilden. Das zyklische AMP trägt als sogenannter Second-messenger das durch die Proteohormone ausgelöste hormonale Primärsignal vermittelnd an spezifische Schaltstellen im Intermediärstoffwechsel (19-24). Die Folge ist, daß durch den Einfluß auf eine Proteinkinase spezifische Proteine phosphoryliert und über die Phosphorylierung in ihrer biologischen Aktivität beeinflußt werden können. Der Aufklärung des Wirkungsmechanismus der Proteohormone hat die Arbeitsgruppe um Sutherland (19, 25-26) entscheidende Impulse gegeben.

Der molekulare Angriffspunkt der niedrigmolekularen Steroidhormone ist im Gegensatz zu den Proteohormonen intrazellulär. Der modernen Auffassung vom Wirkungsmechanismus der Steroidhormone zufolge, die auf bahnbrechende Untersuchungen von vor ca. 15 Jahren von Jensen und Mitarbeiter (27) zurückgeht, wirken die Steroidhormone über sogenannte intrazelluläre Rezeptorproteine (28-34). Nach Eindringen des Steroidhormons in die spezifische Targetzelle wird es unter Bildung eines Steroidhormon-Rezeptorkomplexes an ein Rezeptorprotein gebunden. Der Steroidhormon-Rezeptorkomplex penetriert nach Transformation der molekularen Konformation des Rezeptorproteins in den Zellkern und assoziiert mit dem Chromatin, dem Träger der Erbinformation (28, 35-41).

UTERUS - ZELLE

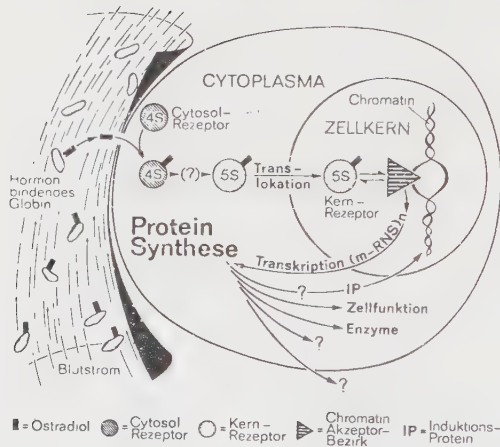


Abb. 2

Moderne Auffassung vom Wirkungsmechanismus der Steroidhormone, dargestellt am Beispiel der Uterus-Zelle.

Für die Assoziation am Chromatin ist ein sogenannter Akzeptorbezirk verantwortlich, der, wie heute allgemein angenommen, ein "regulatorisches" Nicht-Histon-Protein ist (28, 42). Die Fixation des Steroidhormon-Rezeptorkomplexes am Akzeptorbezirk des Chromatins führt nun zu einer Stimulierung der RNS-Synthese. Am Ende der Kette der Ereignisse steht die Neubildung spezifischer Proteine.

Im Rahmen der Frage nach der Ätiologie des Mamma-Karzinoms wird eine Dysregulation der an der Brustdrüse angreifenden Peptid- bzw. Steroidhormone diskutiert, wobei der Regulationsmechanismus von Östrogen

am besten untersucht ist. Die moderne Rezeptorforschung konnte zeigen, daß ein enger Zusammenhang zwischen der Östrogen-Rezeptorkonzentration und dem Remissionsverhalten des Mamma-Karzinoms des Menschen nach der sogenannten ablativen endokrinen Therapie besteht (43-44). Unter ablativer endokriner Therapie werden die Ausschaltung endogener Östrogenquellen durch Maßnahmen wie Ovariectomie, Adrenalectomie, Hypophysektomie und die Zufuhr anti-östrogen-wirksamer Steroidhormone verstanden. In breit angelegten Untersuchungen (43, 45-47) konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen in den letzten Jahren gezeigt werden, daß mit hochsensitiven Methoden in 70 bis 85% der Cytoplasmafraktionen neoplastisch veränderten Mammagewebes östradiolbindende Rezeptorproteine nachweisbar sind. Diese sogenannten Östradiolrezeptor-positiven Mamma-Karzinome reagieren auf die ablative endokrine Therapie mit bis zu 55% Remissionen im Primärtumor. Dagegen sprechen die sogenannten Östradiolrezeptor-negativen Tumoren nur bis zu 8% mit einer Remission auf die entsprechende Therapie an (43).

Obwohl verschiedene Untersuchungen (1, 13-18) darauf hinweisen, daß Progesteron ebenfalls Wachstum und Funktion des normalen Mammagewebes reguliert, ist bis heute nur wenig über den Progesteron-Rezeptormechanismus in der normalen und der neoplastisch veränderten Brustdrüse bekannt. Einer der Gründe für das geringe Wissen über die spezifischen Progesteronrezeptoren im Mammagewebe des Menschen mag in der Schwierigkeit begründet liegen, bei der Cytoplasmapräparation eine Kontamination der cytoplasmatischen Proteine mit Serumproteinen wie CBG zu verhindern (48).

CBG ist ein Serum-Transportprotein, das hochkapazitiv, dabei aber niedrigaffin, Progesteron zu binden vermag. Kürzlich konnten Horwitz und McGuire (49) das Vorhandensein spezifisch progesteronbindender Komponenten in den Cytoplasmafraktionen von 11 von 33 Mamma-Karzinomen des Menschen demonstrieren. Sie verwendeten das hochaktive, gestagen-wirksame synthetische R 5020 (50) der Firma Roussel, Frankreich, eine Verbindung, die aufgrund ihrer chemischen Struktur ausschließlich am Progesteronrezeptor fixiert wird und nicht mit dem Serum-CBG kompetiert.

1.2 EIGENE PROBLEMSTELLUNG

Absicht der vorliegenden Arbeit ist es:

1. den Progesteronrezeptor im Mammagewebe des Menschen durch biochemische Parameter zu charakterisieren,
2. ähnlich wie am Endometrium, bzw. Myometrium, Korrelationen zwischen dem endokrinen Status (Menstruationszyklus) und der intrazellulären Progesteron-Rezeptorkonzentration zu finden und
3. einen Vergleich zwischen dem Progesteron-Rezeptorgehalt der Normalzelle und der neoplastisch veränderten Zelle der selben Brustdrüse vorzunehmen.

Anschließend wird die mögliche Rolle des Progesteronrezeptors im Rahmen der Karzinomätiologie der Brustdrüse des Menschen diskutiert.

II S P E Z I E L L E R T E I L

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 STEROIDE

1,2-³H-Progesteron (S.A. 53 Ci/mMol) wurde von The Radiochemical Centre, Amersham, England, bezogen; seine radiochemische Reinheit wurde periodisch durch Dünnschichtchromatographie auf Silikagel untersucht. Als Laufmittel diente Benzol/Essigsäureäthylester (3/2, Vol./Vol.). Die nicht radioaktiv markierten Steroide waren ein Geschenk der Firma Schering AG, Berlin, Deutschland.

2.1.2 CHEMIKALIEN

Ampholin, pH 3.5-10: LKB Instruments, Stockholm, Schweden; Bio-Gel A-0.5m (200-400 mesh): Bio-Rad-Laboratories, München, Deutschland; DEAE-Sephadex A-50, Dextran T 70 und Blue Dextran 2000: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden; Rinder-Serumalbumin: Sigma Chemical Company, USA. Alle übrigen Chemikalien waren von p.a. Reinheitsgrad und wurden von der Firma Merck AG, Darmstadt, Deutschland, bezogen.

2.1.3

GEWEBE

37 Gewebeproben aus Mamma-Karzinomen des Menschen wurden zusammen mit ebensoviel Gewebeproben nicht pathologisch veränderten Mammagewebes, die denselben karzinomtragenden Brustdrüsen entnommen worden waren, untersucht. Die Gewebeproben wurden durch Mastektomie gewonnen und innerhalb von 10 Minuten post operationem mit dem fünffachen Volumen 0.01 M Tris/HCl-Puffer (pH 7.4) bei 4°C gewaschen. Fettgewebe und nekrotische Anteile wurden entfernt. Jeweils ein Teil der einzelnen Gewebeprobe wurde für die histopathologische Untersuchung abgetrennt. Alle Gewebeproben, die in der Prämenopause entnommen worden waren (27 Fälle), wurden in Bezug auf die Zyklusphase datiert. Dazu wurde Endometrium durch Strichcurettage gewonnen und nach der von Noyes und Mitarbeiter (51) beschriebenen Methode histologisch untersucht.

2.2

METHODEN

2.2.1

CYTOPLASMAPRÄPARATION

Die gewaschenen Gewebeproben wurden 1:4 (Gew./Vol.) mit 0.01 M Tris/HCl-Puffer, pH 7.4, 1 mM EDTA, 12 mM Mercaptoäthanol und 20 % Glycerin (Vol./Vol.) versetzt und 30 sec im Ultratourax (220 Volt) unter Eiskühlung zerkleinert, anschließend der Gewebebrei in einen Potter-Elvehjem (Glashomogenisator mit Teflonstempel) übergeführt und durch fünfmaligen

Vor- und Rücklauf homogenisiert. Das Homogenat wurde durch 4 Schichten Verbandsmull filtriert und das Filtrat für 20 Minuten bei 20 000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen, der Überstand zur Präparation der Cytoplasmafraktion für 90 Minuten bei 105 000 g (40 000 Upm, Rotor Ti 50, Firma Beckman) zentrifugiert. Der 105 000 g-Überstand entspricht der Cytoplasmafraktion. Die Cytoplasmafraktion wurde für 20 Minuten bei 4°C mit Dextran-Aktivkohle behandelt (2.5 mg Aktivkohle, 0.25 mg Dextran/ml Cytoplasma), um das endogene freie Steroid zu entfernen. Anschließend wurde die dextranbeschichtete Aktivkohle durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 20 000 g entfernt.

2.2.2 PLASMA

Blut schwangerer Frauen wurde 1:10 mit 0.01 M Tris/HCl-Puffer, pH 7.4, verdünnt, die partikulären Bestandteile durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 27 000 g sedimentiert und anschließend der Überstand für 60 Minuten bei 105 000 g zentrifugiert. Der 105 000 g-Überstand wird als "Plasma" bezeichnet.

2.2.3 ÄQUILIBRIERUNGSDIALYSE

Die Progesteron-Rezeptorkonzentrationen in Cytoplasmafraktionen aus nicht pathologisch verändertem Mammagewebe und Mamma-Karzinomen des Menschen wurden mit der von Davies (52) beschriebenen Methode der multiplen Äquilibrierungsdialyse bestimmt. Die Dia-

lysen wurden bei 4°C durchgeführt; die Dialysedauer betrug 40 Stunden. In Scintillations-Zählfläschchen befanden sich in 0.01 M Tris/HCl-Puffer, pH 7.4, 1 mM EDTA, 12 mM Mercaptoäthanol und 20 % Glycerin (Vol./Vol.) gelöst 2 nM ^3H -Progesteron und steigende Konzentrationen nicht radioaktiv markierten Progesterons (0.2-50 nM). Im Dialysesäckchen war jeweils 1 ml Cytoplasma (1 mg Protein/ml) enthalten, da sich bei dieser Proteinkonzentration das Innenvolumen während der Dialyse nicht ändert. Die Dialysen wurden sowohl mit als auch ohne Zusatz von jeweils 100 nM nicht radioaktiv markiertem Cortisol ausgeführt, wobei das Cortisol die Aufgabe hatte, eine Bindung von Progesteron an corticosteroidbindendes Globulin (CBG) zu verhindern. Im Rahmen der Cytoplasmapräparation ist eine Verunreinigung der intrazellulären cytoplasmatischen Proteine durch Serumprotein (wie z.B. CBG) nicht zu vermeiden. Nach Erreichen des Äquilibriumszustandes wurden die ^3H -Radioaktivität in der äußeren Lösung und die der inneren Lösung (im Dialysesäckchen) gemessen. Anschließend wurden nach der von Scatchard (53) beschriebenen Methode durch Linearisierung der Werte die Progesteron-Rezeptorkonzentration sowie die Assoziationskonstante für den Progesteron-Rezeptorkomplex bestimmt.

2.2.4 SACCHAROSE-DICHTEGRADIENTEN-ZENTRIFUGATION

Zur ^3H -Markierung der cytoplasmatischen Progesteronrezeptoren aus Mammagewebe des Menschen wurde die Cytoplasmafraktion in Gegenwart von 2 nM ^3H -Progesteron mit und ohne Zusatz nicht radioaktiv markierter

Steroide (relativ zur ^3H -Progesteronkonzentration im 50fachen Überschuß) 4 Stunden bei 4°C inkubiert. Jeweils 0.2 ml Cytoplasmafraktion wurden über einen linearen Saccharosegradienten (5-20 % Saccharose, Gew./Vol., in 0.01 M Tris/HCl-Puffer, pH 7.4, 1 mM EDTA, 12 mM Mercaptoäthanol, 0.3 M KCl und 10 % Glycerin, Vol./Vol.) geschichtet und für 16 Stunden bei 234 000 g (Rotor SW 65, Firma Beckman) zentrifugiert. Als Referenzproteine zur Bestimmung der S-Werte wurden Ovalbumin und Alkohol-Dehydrogenase verwendet. Der Gradient wurde mit Hilfe der Isco-Fraktionierungseinrichtung automatisch fraktioniert, und in jeweils 0.1 ml der unverdünnten Fraktionen wurde die Radioaktivität gemessen.

2.2.5 AGAROSE-GELFILTRATION

Bio-Gel A-0.5 m wurde mit dem Elutionspuffer (0.01 M Tris/HCl-Puffer, pH 7.4, 1 mM EDTA, 12 mM Mercaptoäthanol, 0.3 M KCl und 20 % Glycerin, Vol./Vol.) in einer Chromatographiesäule (1.5 cm Durchmesser, Füllhöhe 100 cm) äquilibriert. Die Gelausschluß-Charakteristika der Säule wurden mit Referenzproteinen bekannten Molekulargewichts bestimmt. Jeweils 2 ml der ^3H -Progesteron-markierten Cytoplasmafraktionen wurden aufgetragen, und bei einer Durchflußrate von 8.5 ml pro Stunde wurde mit dem Äquilibrierungspuffer eluiert. Jeweils 1.5 ml-Fractionen wurden gesammelt, und in einem Aliquot jeder Einzelfraktion wurde die ^3H -Radioaktivität gemessen.

2.2.6

DEAE-SEPHADEX-CHROMATOGRAPHIE

Chromatographiesäulen (Durchmesser 2 cm, Füllhöhe 5 cm) wurden mit DEAE-Sephadex, das in 0.01 M Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 12 mM Mercaptoäthanol und 20 % Glycerin (Vol./Vol.) äquilibriert war, bis zu einer Füllhöhe von 5 cm beschickt. Die Äquilibration wurde durch Messen des elektrischen Widerstandes im Äquilibrationspuffer und im Eluat verfolgt. Die ^3H -Progesteron-markierte Cytoplasmafraktion wurde in einem Volumen von 2 ml auf das DEAE-Sephadex-Gelbett aufgetragen und mit 30 ml äquilibrierendem Puffer in die Säule eingewaschen. Anschließend wurde mit einem linearen KCl-Gradienten (300 ml, 0-0.4 M) eluiert. Das Eluat wurde in 1.5 ml-Fractionen gesammelt. Jeweils in einem Aliquot wurde ^3H gemessen.

2.2.7

ISOELEKTROFOKUSSIERUNG

Je 2 ml der ^3H -Progesteron-markierten Cytoplasmafraktionen wurden nach der Methode von Vesterberg und Mitarbeiter (54) der isoelektrischen Fokussierung in einer kommerziellen LKB-Säule 110 ml in einem automatisch hergestellten linearen Saccharose-Dichtegradienten (0-50 g/100 ml) in 1 % Trägerampholyten (pH 3.5-10) unterworfen. Zur Stabilisierung der ^3H -Progesteron-Rezeptorkomplexe wurden dem Dichtegradienten 20 % Glycerin (Vol./Vol.) zugesetzt. Die Isoelektrofokussierung war nach ca. 45 Stunden beendet (Abfall der Stromstärke auf einen konstanten Wert). Die Isoelektrofokussiersäule wurde in 2 ml-Fractionen entleert, die Elutionsgeschwindig-

keit betrug 1 ml pro Minute. In jeder Fraktion wurde der pH-Wert gemessen; in einem Aliquot jeder Fraktion wurde die ^3H -Radioaktivität bestimmt.

2.2.8 KOMPETITIONSSSTUDIEN

Jeweils 0.2 ml der Cytoplasmafraktion wurden mit 1 nM ^3H -Progesteron und steigenden Mengen nicht radioaktiv markierter Kompetitorsteroiden für 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Nicht gebundene Steroide wurden von den Steroidhormon-Rezeptorkomplexen mit Hilfe der Aktivkohle-Adsorptionstechnik getrennt. Die Cytoplasmafraktion wurde jeweils mit 0.5 ml dextranbeschichteter Aktivkohle (0.25 g Aktivkohle, 0.025 g Dextran pro 100 ml), 0.01 M Tris/HCl-Puffer, pH 7.4, 1 mM EDTA, 12 mM Mercaptoäthanol, 20 % Glycerin, Vol./Vol.) für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend folgte die Zentrifugation der Aktivkohle bei 8 000 g für 10 Minuten. Jeweils in einem Aliquot wurde die Radioaktivität gemessen.

2.2.9 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Lowry und Mitarbeiter (55) mit Rinder-Serumalbumin als Standardprotein bestimmt.

2.2.10 RADIOAKTIVITÄTSMESSUNG

Die ^3H -Radioaktivität wurde im Flüssigkeits-Scintillationszähler der Firma Berthold, Wildbad, Deutschland (BF 5000), unter Verwendung von Dioxan-PPO-POPOP-Scintillationslösung bestimmt; die Zählubeute für ^3H betrug ca. 38 %.

III E R G E B N I S S E

3.1 CHARAKTERISIERUNG DER PROGESTERON- BINDENDEN KOMPONENTE DER CYTOPLASMA- FRAKTION VON MAMMAGEWEBE DES MENSCHEN

3.1.1 SACCHAROSE-DICHTEGRADIENTEN-ZENTRIFUGATION

Einen ersten Hinweis auf die Existenz progesteronbin-
dender Rezeptormoleküle in der Cytoplasmafraktion von
Mammagewebe des Menschen erbrachte die Saccharose-
Dichtegradienten-Zentrifugation. Wie aus Abb. 3A zu
entnehmen ist, sedimentierte der ^3H -Progesteron-Rezep-
torkomplex nach Zentrifugation der ^3H -Progesteron-
markierten Cytoplasmafraktion über einen linearen Sac-
charose-Dichtegradienten (5-20 %, Vol./Vol., unter Zu-
satz von 0.3 M KCl) im 4S-Bereich. Die Inkubation der
Cytoplasmafraktion in Gegenwart eines 50fachen Über-
schusses (relativ zur Progesteronkonzentration) nicht
radioaktiv markierter Steroide reduzierte nur in Ge-
genwart von Progesteron als Kompetitorsteroid die Bin-
dungsaktivität im 4S-Bereich bis nahezu auf die Basal-
linie.

Abb. 3B macht deutlich, daß das corticosteroidbindende
Globulin (CBG aus dem "Plasma") im linearen Saccharo-
se-Dichtegradienten das gleiche Sedimentationsverhal-
ten wie der cytoplasmatische Progesteron-Rezeptor-
komplex aus Mammagewebe zeigt. Das bedeutet, daß mit
der Methode der Dichtegradienten-Zentrifugation in
Gegenwart von 0.3 M KCl eine Separierung des spezifi-
schen progesteronbindenden intrazellulären Rezeptor-
moleküls vom hochkapazitiv, aber niedrigaffin binden-
den Serum-CBG nicht möglich ist.

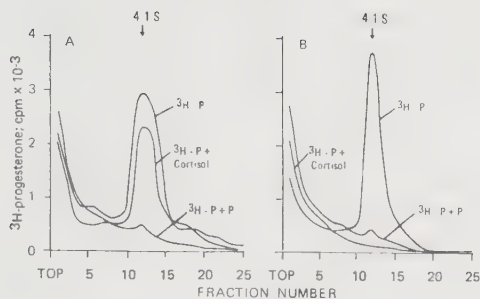


Abb. 3

A

B

Saccharose-Gradienten-Zentrifugation der ^3H -Progesteron-bindenden Komponenten im normalen Mamma-Cytoplasma des Menschen (A) und im "Plasma" schwangerer Frauen (B).

Cytoplasma und "Plasma" wurden für 4 Stunden bei 4°C mit 2 nM ^3H -Progesteron mit und ohne 50fachen Überschuß nicht markierter Steroide (relativ zum ^3H -Progesteron) inkubiert und, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben, über einen Saccharose-Gradienten zentrifugiert.

Wie der Abb. 4 zu entnehmen ist, sedimentiert der cytoplasmatische ^3H -Progesteron-Rezeptorkomplex aus normalem Mammagewebe des Menschen im KCl-freien Puffermedium nach Zentrifugation über einen linearen Saccharose-Dichtegradienten sowohl im 4S- als auch im 8S-Bereich. Die Sedimentationskoeffizienten wurden durch simultane Zugabe von Ovalbumin und Alkohol-Dehydrogenase als interne Referenzproteine bestimmt.

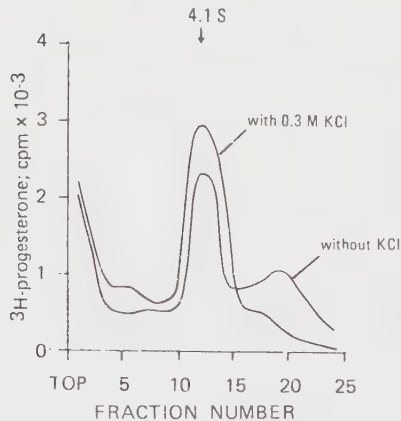


Abb. 4

Einfluß von KCl auf das Sedimentationsverhalten ^3H -Progesteron-bindender Rezeptorproteine der Cytoplasmafraktion aus normalem Mammagewebe des Menschen. Cytoplasma wurde für 4 Stunden bei 4°C mit 2 nM ^3H -Progesteron ohne und mit Zusatz von KCl zum Puffermedium inkubiert, und, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben, über einen Saccharose-Dichtegradienten zentrifugiert.

3.1.2

AGAROSE-GELFILTRATION

Abb. 5 zeigt typische Elutionsprofile nach Gelfiltration der ^3H -Progesteron-markierten Cytoplasmafraktion aus nicht pathologischem Mammagewebe des Menschen und des ^3H -Progesteron-, bzw. ^3H -Cortisol-markierten "Plasmas" über Agarose-Gel. Der Elutionspuffer enthielt 0.3 M KCl. Die Inkubationen zur ^3H -Markierung der cytoplasmatischen Rezeptorproteine, bzw. der Serumproteine, wurden ohne und mit Zusatz eines exzessiv hohen Überschusses nicht radioaktiv markierter Steroide zum Inkubationsmilieu durchgeführt. Das freie, nicht an Protein gebundene Steroidhormon eluierte mit dem Gesamtvolumen der Säule (Fraktionen >80). Die ^3H -Progesteron-bindende Proteinkomponente der Cytoplasmafraktion eluierte zwischen den Fraktionen 55 und 65 als einheitlicher Peak. Das Elutionsprofil der ^3H -Progesteron-, bzw. ^3H -Cortisol-markierten Serumproteine (CBG) ähnelte dem der ^3H -Progesteron-markierten Cytoplasmafraktion auffallend. Die Inkubation der Cytoplasmafraktion in Gegenwart eines hohen Überschusses nicht radioaktiv markierten Progesterons (relativ zur ^3H -Progesteronkonzentration) reduzierte die ^3H -Progesteron-Bindungsaktivität zwischen den Fraktionen 55 und 65 beträchtlich. Dagegen war nicht radioaktiv markiertes Cortisol nur in geringem Ausmaß in der Lage, ^3H -Progesteron aus den spezifischen Bindungsbezirken des Rezeptorproteins zu verdrängen (Abb. 5A).

Im Gegensatz dazu drängte ein hoher Überschuß nicht markierten Cortisols im Inkubationsansatz des ^3H -Progesteron-markierten "Plasmas" die Bindungsaktivität des CBG für ^3H -Progesteron nahezu bis auf die Basallinie zurück (Abb. 5B).

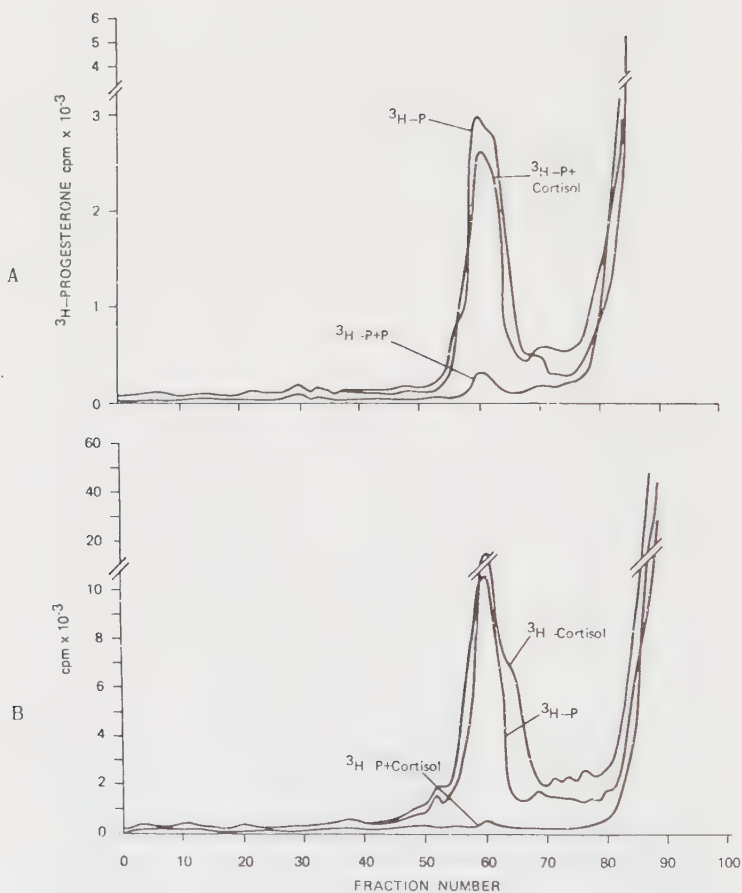


Abb. 5
Elutionsprofile nach Agarose-Gelfiltration der ^3H -Progesteron-markierten Cytoplasmafraktion aus Mammagewebe des Menschen (A) und des ^3H -Progesteron-, bzw. ^3H -Cortisol-markierten "Plasmas" (B). Cytoplasma und "Plasma" wurden für 4 Stunden bei 4°C mit 2 nM ^3H -Progesteron oder ^3H -Cortisol mit und ohne 50fachen Überschuß nicht markierter Steroide (relativ zu ^3H -Progesteron, bzw. ^3H -Cortisol) inkubiert. Bio-Gel A-0.5 m-Säulen wurden mit 0.01 M Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 12 mM Mercaptoäthanol, 0.3 M KCl mit 20% Glycerin (Vol./Vol.) eluiert.

3.1.3 DEAE-SEPHADEX-CHROMATOGRAPHIE

Die Elutionsprofile nach DEAE-Sephadex-Chromatographie der ^3H -Progesteron-markierten cytoplasmatischen Rezeptorkomponenten aus normalem Mammagewebe des Menschen sind in Abb. 6 dargestellt. Freies, nicht an Protein gebundenes ^3H -Progesteron eluierte mit dem äquilibrierenden Puffer (Fraktionen 1-16). Die sich anschließende Elution mit einem linearen KCl-Gradienten ergab drei radioaktiv markierte Peaks (Fraktionen 20-25, 26-40, 50-80). Der Hauptanteil der ^3H -Progesteron-markierten Proteine eluierte in den mehr sauren Fraktionen.

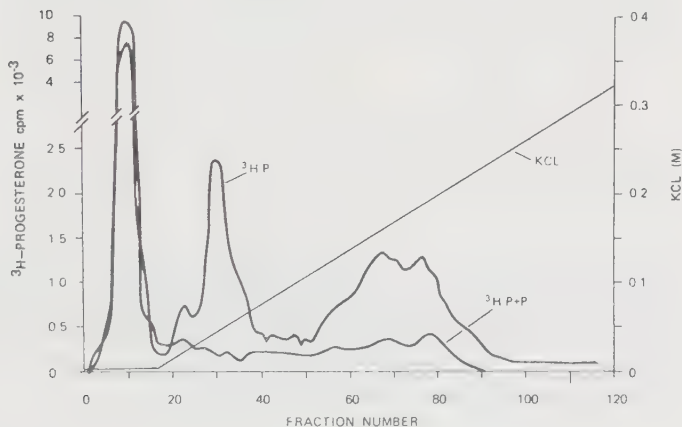


Abb. 6

Elutionsprofile nach Ionenaustausch-Chromatographie der ^3H -Progesteron-bindenden Komponenten im Mamma-Cytoplasma des Menschen mit DEAE-Sephadex. Die Cytoplasmafraktionen wurden mit 2 nM ^3H -Progesteron für 4 Stunden bei 4°C mit und ohne 50fachen Überschuß nicht markierten Progesterons inkubiert. Nach Applikation der Proben (2 ml) wurden die Säulen (2x5 cm) mit 0.01 M Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 12 mM Mercaptoäthanol mit 20% Glycerin (Vol./Vol.) gewaschen und über einen linearen KCl-Gradienten mit demselben Puffer eluiert.

3.1.4

ISOELEKTROFOKUSSIERUNG

Die isoelektrische Fokussierung der ^3H -Progesteron-markierten Cytoplasmafraktion aus normalem Mammagewebe des Menschen in einem linearen pH-Gradienten (pH 3.5-10) ergab einen Haupt-Radioaktivitätspeak mit einem isoelektrischen Punkt von pH 5.0 (Abb. 7).

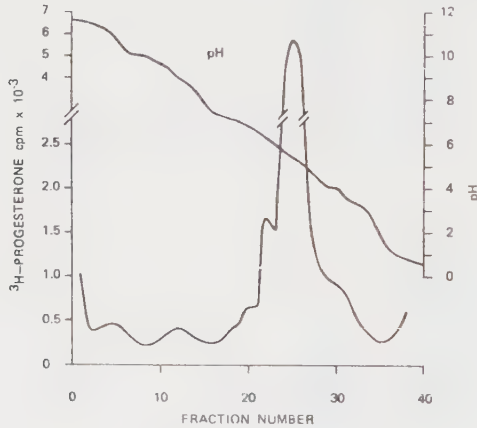


Abb. 7

Isoelektrofokussierung der ^3H -Progesteron-markierten Cytoplasmafraktion aus normalem Mammagewebe des Menschen in einer Fokussiersäule (110 ml) mit einem linearen Saccharosegradienten unter Zusatz von 1% (Vol./Vol.) Trägerampholyten (pH 3.5-10). Nach Entleerung in 2 ml-Fractionen wurden in jeder Fraction pH und Radioaktivität gemessen.

3.1.5

KOMPETITIONSSSTUDIEN

Kompetitionsversuche zwischen ^3H -Progesteron und nicht radioaktiv markierten Steroidhormonen unterschiedlicher biologischer Aktivität sollten Aufschluß über die Substratspezifität der in der Cytoplasmafraktion normalen Mammagewebes des Menschen lokalisierten progester-

ronbindenden Rezeptorkomponente geben. Dabei war die Abnahme der ^3H -Progesteronbindung in der Cytoplasmafraktion nach Inkubation von ^3H -Progesteron in Gegenwart der Kompetitorsteroide das Maß für deren Inhibitorwirkung. Die Ergebnisse sind in Abb. 8 zusammengefaßt. Die folgenden Kompetitorsteroide inhibierten die ^3H -Progesteronbindung in abnehmender Effizienz: Progesteron, 5 α -Dihydroprogesteron, Medroxyprogesteron (ein synthetisches, hochaktives Gestagen), Cortisol und 20 α -Dihydroprogesteron. Die durch Cortisol bei 100fachem Überschuß gegenüber ^3H -Progesteron ausgelöste Konkurrenz betrug bis zu 20%. Testosteron sowie Östradiol-17 β zeigten auch in hohen Konzentrationen keine Affinität gegenüber dem aktiven Bindungszentrum der ^3H -Progesteron-bindenden Komponente.

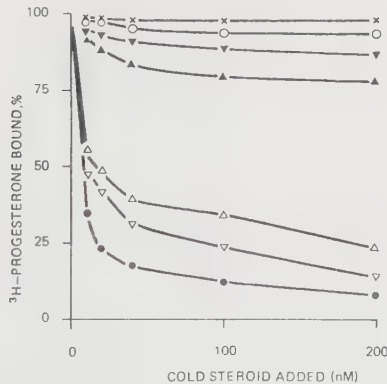


Abb. 8 .

Inhibition der ^3H -Progesteronbindung in normalem Mamma-Cytoplasma des Menschen durch verschiedene nicht markierte Kompetitorsteroide.

(●)=Progesteron (▼)=20 α -Dihydroprogesteron
 (▽)=5 α -Dihydroprogesteron (○)=Testosteron
 (△)=Medroxyprogesteron (×)=17 β -Östradiol
 (▲)=Cortisol

3.1.6

TEMPERATUREINFLUSS

Um Unterschiede zwischen den Serumproteinen und dem hochspezifisch bindenden cytoplasmatischen Progesteronrezeptor des Mammagewebes aufzudecken, wurde der Einfluß der Inkubationstemperatur auf das Bindungsverhalten von ^3H -Progesteron gegenüber dem cytoplasmatischen Rezeptorprotein, bzw. dem unspezifisch bindenden Serumprotein, geprüft. Es zeigte sich, daß bei ca. 5°C der cytoplasmatische Progesteronrezeptor sein Bindungsmaximum hat. Erhöhung der Temperatur hat einen steilen Abfall der Bindungsaktivität des cytoplasmatischen Progesteronrezeptors gegenüber ^3H -Progesteron zur Folge.

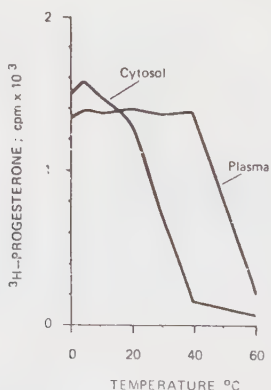


Abb. 9

Einfluß der Inkubationstemperatur auf die ^3H -Progesteronbindung in normalem Mamma-Cytosol des Menschen und im "Plasma" schwangerer Frauen. Die Proben wurden für 4 Stunden bei Temperaturen zwischen 0 und 60°C unter Zusatz von je 2 nM ^3H -Progesteron inkubiert. Ungebundenes und gebundenes Steroid wurden mit der Charcoal-Technik getrennt; im Überstand wurde die ^3H -Radioaktivität gemessen.

Die Serumproteine hingegen zeigten bei Temperaturen zwischen 0 und 50°C gleichbleibend hohe Bindungseigenschaften gegenüber ^3H -Progesteron. Erst bei Anstieg der Temperatur über 50°C kam es zu einem steilen Abfall der Bindungsaktivität der Serumproteine gegenüber ^3H -Progesteron, was auf ihre Hitzedenaturierung zurückzuführen ist. Diese Befunde zeigen, daß bezüglich der Thermostabilität deutliche Unterschiede zwischen dem cytoplasmatischen Progesteron-Rezeptorprotein und den unspezifisch bindenden Serumproteinen bestehen.

3.1.7 KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN

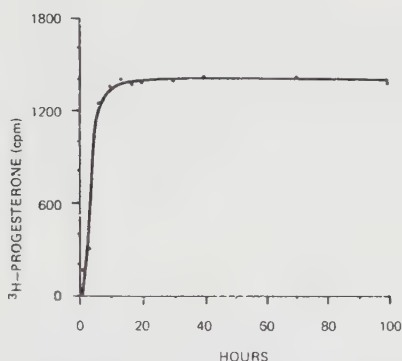


Abb. 10

Bindung von ^3H -Progesteron an spezifische Rezeptorproteine aus normalem Mammagewebe des Menschen als Funktion der Zeit.

Nach Davies (52) wurden Äquilibrierungsdialysen mit variabler Dauer durchgeführt. In die äußere Lösung wurde jeweils 2 nM ^3H -Progesteron gegeben; die Dialysesäckchen enthielten je 1 ml Cytoplasmafraktion (1 mg Protein/ml). Nach Beendigung der Dialyse wurden in jedem Dialysesäckchen die cpm gemessen und auf der Ordinate abgetragen. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus drei Bestimmungen dar.

In Abb. 10 ist die Bindung von ^3H -Progesteron an cytoplasmatische Rezeptorproteine aus normalem Mammagewebe des Menschen als Funktion der Zeit dargestellt. Es zeigt sich, daß nach ca. 10 Stunden bei einer Inkubationstemperatur von 4°C Äquilibrierung erreicht wurde und der Progesteron-Rezeptorkomplex unter Äquilibrierungsbedingungen bis zu 100 Stunden Inkubationsdauer stabil blieb.

In Abb. 11 ist das Dissoziationsverhalten des ^3H -Progesteron-Rezeptorkomplexes aus der Cytoplasmafraktion normalen Mammagewebes des Menschen dargestellt. 20 ml Cytoplasmafraktion wurden in Gegenwart von 2 nM ^3H -Progesteron für 16 Stunden bei 4°C inkubiert; anschließend wurde mit Hilfe der Aktivkohle-Dextrantechnik ungebundenes von an Protein gebundenem ^3H -Progesteron separiert und dem ^3H -Progesteron-Rezeptorkomplex (Zentrifugationsüberstand) nach Dextran-Aktivkohlebehandlung ein 50facher Überschuß nicht radioaktiv markierten Progesterons zugesetzt. Aliquote dieser Lösung wurden für unterschiedlich lange Zeiträume (bis zu 20 Stunden) gegen Puffer dialysiert. Es wurde jeweils die im Dialysesäckchen verbleibende Restradioaktivität gemessen. Mit der Extrapolation der Anfangssteigung der Dissoziationskurve auf die Abszisse ergab sich, daß nach ca. 10 Stunden ein Äquilibrierungszustand mit dem vorhandenen endogenen, nicht radioaktiv markierten Steroidhormon erreicht worden war, und daß die nach ca. 20 Stunden verbleibende Restbindung von ^3H -Progesteron die Re-Assoziation mit nicht zu sättigenden, unspezifisch bindenden Komponenten der Cytoplasmafraktion widerspiegelt.

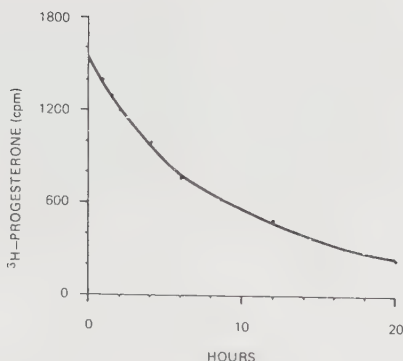


Abb. 11

Dissoziation des cytoplasmatischen ^3H -Progesteron-Rezeptorkomplexes aus normalem Mammagewebe des Menschen.

20 ml Cytoplasma (1 mg Protein/ml) wurden in Gegenwart von 2 nM ^3H -Progesteron für 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Mit der Aktivkohle-Dextrantechnik wurde das ungebundene ^3H -Progesteron von gebundenem separiert, anschließend wurde dem ^3H -Progesteron-Rezeptorkomplex ein 50facher Überschuß nicht radioaktiv markierten Progesterons zugesetzt; dann wurden Aliquote unterschiedlich lange gegen Inkubationspuffer dialysiert. Schließlich wurden Aliquote für die ^3H -Messung entnommen. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus drei Bestimmungen dar.

3.2 BESTIMMUNG DER PROGESTERON-REZEPTOR-KONZENTRATION IN NORMALEM UND NEOPLASTISCH VERÄNDERTEM BRUSTDRÜSENGEWEBE DES MENSCHEN

Wie Abb. 12 zu entnehmen ist, ist die cytoplasmatische Progesteron-Rezeptorkonzentration in normalem Mammagewebe von Prämenopause-Patientinnen abhängig vom Menstruationszyklus: Niedrige Rezeptorkonzentrationen in der frühen Proliferationsphase, steiler Anstieg in

der späten Proliferationsphase mit Maximalwerten zum Zeitpunkt der Ovulation, dann langsamer Abfall in der frühen Sekretionsphase, verbunden mit niedrigen Werten in der späten Sekretionsphase. Eine gleichzeitige Messung der endogenen, in der Mammazelle vorhandenen Progesteronkonzentration wurde nicht vorgenommen.

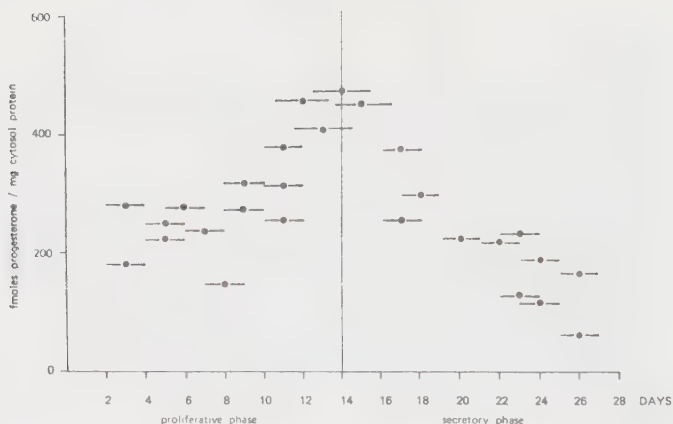


Abb. 12

Progesteron-Rezeptorkonzentration in der Cytoplasmafraktion aus normalem Mammagewebe des Menschen in Abhängigkeit vom Menstruationszyklus. Die Bindungsaktivität wurde mit der multiplen Äquilibriumdialyse nach Davies (52) bestimmt. Die 27 Mammagewebeproben von Prämenopause-Patientinnen wurden hinsichtlich ihrer Progesteron-Rezeptorkonzentrationen und der jeweiligen Zyklusphasen korreliert. Dazu wurden Endometrium-Gewebeproben nach der Methode von Noyes und Mitarbeiter (51) histologisch untersucht. Jeder Punkt ergibt sich durch den Mittelwert aus zwei Bestimmungen.

Tabelle 1 faßt die Ergebnisse der Bestimmungen der Progesteron-Rezeptorkonzentrationen sowie der Assoziationskonstanten der Progesteron-Rezeptorkomplexe zusammen. Sie wurden im Rahmen vergleichender Untersuchungen zwischen neoplastischem und normalem Mammgewebe -das jeweils zum unmittelbaren Vergleich der selben karzinomtragenden Brust entnommen worden war- gewonnen.

Pat.	Menstruations- zyklus	Karzinom- typ	Progesteron-Rezeptorkonzentration (fMol / mg Protein)		K_m ($10^9 M^{-1}$)	
			Normalgewebe	Mamma-Karzinom	Normalgewebe	Mamma-Karzinom
M.R.	Proliferations- phase	C III	184	123	2,54	3,12
G.L.		C II	287	120	2,11	2,87
V.St.		C II	225	82	2,28	4,11
A.W.		C II	252	155	2,14	2,13
B.K.		C II	273	74	2,03	5,08
Y.Q.		C II	240	67	1,58	4,48
H.K.		C II	150	157	2,11	2,11
S.N.		C II	273	134	1,44	2,02
B.K.		C III	320	n.m.	0,91	n.m.
K.Sch.		C III	260	47	1,18	3,68
L.K.		C I	320	n.m.	1,12	n.m.
A.B.		C I	380	273	0,93	1,61
R.A.		C II	460	355	0,81	1,12
G.U.		C II	410	103	0,51	2,11
G.Sch.		C II	475	163	0,77	1,86
		$\bar{n}=15$	300 $\pm$ 95 S.A.	123 $\pm$ 294 S.A.	1,5 $\pm$ 0,66	2,8 $\pm$ 1,2
Ch.M.	Sekretionsphase	C II	450	222	0,76	1,18
M.R.		C II	380	152	1,03	2,31
D.J.		C II	261	133	1,08	2,68
D.C.		C II	300	72	0,96	3,08
M.Pf.		C II	225	n.m.	1,28	n.m.
A.P.		C II	220	n.m.	1,17	n.m.
A.H.		C III	229	n.m.	1,22	n.m.
S.R.		C III	190	138	1,58	2,77
H.Sch.		C III	130	98	1,77	3,14
M.L.		C I	120	106	1,44	2,68
A.H.		C III	108	60	2,71	4,01
K.N.		C I	66	162	1,56	2,61
		$\bar{n}=12$	228 $\pm$ 109 S.A.	96 $\pm$ 70 S.A.	1,50 $\pm$ 0,53	2,8 $\pm$ 0,83
I.K.	Postmenopause	C III	168	74	1,12	1,63
M.G.		C III	153	73	1,18	1,67
L.P.		C III	121	108	1,25	1,44
H.H.		C III	131	56	1,16	1,84
E.H.		C III	98	34	2,01	2,33
C.E.		C III	112	38	1,56	2,12
A.E.		C I	56	12	2,14	3,08
M.U.		C II	88	57	2,02	2,01
E.B.		C II	112	102	1,98	1,50
G.K.		C II	131	68	1,42	2,18
		$\bar{n}=10$	117 $\pm$ 52 S.A.	51 $\pm$ 31 S.A.	1,55 $\pm$ 0,44	2,07 $\pm$ 0,67

Tab. 1 Progesteron-Rezeptorkonzentration und K_m -Werte in normalem und neoplastischem Mammgewebe; die normalen Mammgewebeproben wurden in jedem Fall der selben karzinomtragenden Brust entnommen.

* Klassifiziert gemäß den Empfehlungen der WHO;

C I intraduktales und intralobuläres nicht-infiltrierendes Karzinom;

C II infiltrierendes Karzinom;

C III medulläres Karzinom

Aufgrund histologischer Untersuchungen wurden die Mammatumoren histopathologisch typisiert. Eine enge Korrelation zwischen dem auf diese Weise ermittelten Tumortyp und der Progesteron-Rezeptorkonzentration im Tumor konnte nicht beobachtet werden. Als Tendenz zeichnete sich ab, daß die Konzentrationen der Progesteronrezeptoren normalen Mammagewebes über denen der Karzinomgewebeproben lagen. (Schwankungsbreite der Progesteron-Rezeptorkonzentration in Normalgewebe: 56 - 475 fMol/mg Protein; in Karzinomgewebe: 0 (=n.m. =nicht meßbar) - 353 fMol/mg Protein). In fünf Karzinomproben konnten spezifisch progesteronbindende Rezeptorproteine nicht nachgewiesen werden. Die Assoziationskonstanten (K_a) der Progesteron-Rezeptorkomplexe neoplastischen und normalen Mammagewebes lagen zwischen 0.51 und $5.08 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$. Signifikante Unterschiede zwischen Karzinom- und Normalgewebe konnten nicht festgestellt werden.

Die Rezeptorkonzentrationen und Assoziationskonstanten wurden graphisch mit Hilfe von Scatchard-Plots ermittelt (Abb. 13).

In Abb. 14 ist die Progesteron-Rezeptorkonzentration in Abhängigkeit vom Alter der Patientin dargestellt. Wie die Abbildung zeigt, liegen die Werte der Patientinnen in der Prämenopause über denen der Postmenopause-Patientinnen. Einschränkung ist zu bemerken, daß es zur Sicherung dieses Befundes nötig wäre, ein größeres Kontingent von Postmenopause-Patientinnen zu untersuchen.

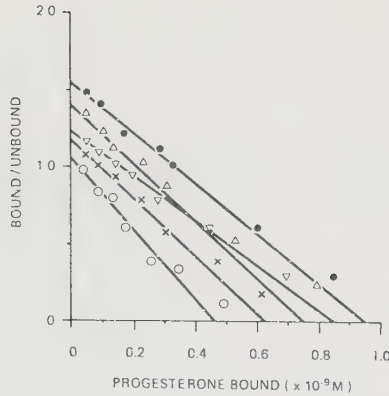


Abb. 13

Graphische Ermittlung der Progesteron-Rezeptorkonzentration und der Assoziationskonstanten für den Progesteron-Rezeptorkomplex in der Cytoplasmafraktion von 5 Mamma-Karzinomproben von Postmenopause-Patientinnen. Jeder Patientin ist ein Symbol zugeordnet. Details sind dem Abschnitt "Material und Methoden" zu entnehmen. Alle Werte wurden auf 1 mg Protein korrigiert.

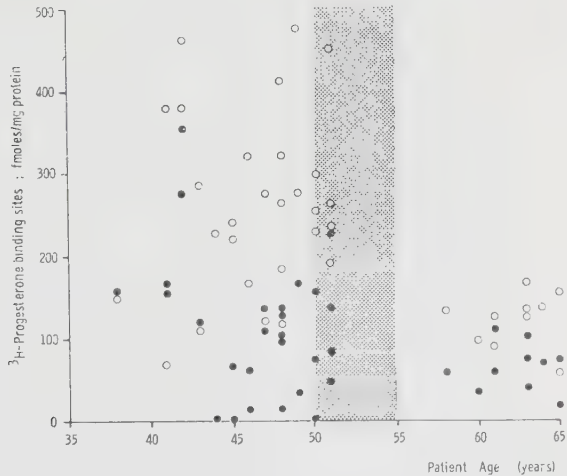


Abb. 14

Progesteron-Rezeptorkonzentration in der Cytoplasmafraktion normalen und neoplastischen Mammagewebes des Menschen in Abhängigkeit vom Alter der Patientin.

○ = Normalgewebe / ● = Karzinomgewebe

IV

D I S K U S S I O N

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Cytoplasma von Mammagewebe des Menschen spezifische progesteronbindende Rezeptorproteine nachzuweisen und zu charakterisieren.

Die Untersuchung spezifischer progesteronbindender cytoplasmatischer Rezeptormoleküle gestaltet sich unter folgenden Gesichtspunkten schwierig:

1. Das progesteronbindende Rezeptormolekül liegt nicht in hochgereinigter Form vor, sondern es wird im Proteinpool der durch Differentialzentrifugation gewonnenen Cytoplasmafraktion untersucht.
2. Im Rahmen des Gewebeaufschlusses ist eine Kontamination der Cytoplasmafraktion mit Serumproteinen nicht zu verhindern; das heißt, sich überkreuzende Reaktionen zwischen dem hochspezifisch und hochaffin bindenden Progesteron-Rezeptormolekül der Cytoplasmafraktion und den im Serum vorkommenden Steroidhormon-bindenden Transportproteinen wie Albumin, saures α_1 -Glykoprotein, CBG und SHBG, können nicht eindeutig ausgeschlossen werden (48).
3. Die Diskriminierung zwischen intrazellulären progesteronspezifischen Rezeptormolekülen und extrazellulären Steroidhormon-Transportproteinen gestaltet sich schwierig, weil z.B. CBG als ein α_1 -Globulin eine ähnliche Bindungsspezifität (neben Cortisol wird Progesteron gebunden), elektrophoretische Mobilität und Sedimentations-Charakteristik im Saccharose-Dichtegradienten auf-

weist wie der spezifische cytoplasmatische Progesteronrezeptor.

Folgende experimentelle Daten der vorliegenden Arbeit liefern aber genügend Argumente für die Existenz eines spezifisch progesteronbindenden Rezeptormoleküls im Erfolgsorgan Human-Mammagewebe:

1. Es zeigte sich, daß der cytoplasmatische Progesteronrezeptor normalen Mammagewebes in Abhängigkeit von der KCl-Konzentration in einem 8 S- (ohne KCl), bzw. in einem 4 S-Bereich (mit 0.3 M KCl) sedimentierte, was mit den Beobachtungen anderer Autoren übereinstimmt (56-64).

CBG zeigt keine vom Salzgehalt des Puffermilieus abhängige Konformationsänderung.

2. Der durch Isoelektrofokussierung ermittelte isoelektrische Punkt des ^3H -Progesteron-markierten cytoplasmatischen Rezeptorproteins lag bei pH 5.0, war also im stärker sauren Bereich lokalisiert als der des CBG.

Schrader et al. (65) lokalisierten den spezifischen Progesteronrezeptor aus Hühner-Eileiter in einem linearen pH-Gradienten bei pH 4-4.5 .

3. Die Kompetitionsstudien zeigten, daß die biologische Aktivität der Kompetitorsteroide und ihre Affinität zum Bindungsbezirk des cytoplasmatischen Progesteron-Rezeptormoleküls eng korrelierten: Ausschließlich gestagen-wirksame Steroide verdrängten Progesteron kompetitiv aus dem Bindungsbezirk des Rezeptormoleküls; Östrogene und Androgene waren wirkungslos; Cortisol zeigte im exzessiv hohen Überschuß (relativ zur Progesteronmenge) eine begrenzte Affinität zum Bindungsbezirk des cytoplasmatischen progesteronbindenden Recep-

tormoleküls.

Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Horwitz und McGuire (49) an normalem Mammagewebe und von Young und Cleary (62), Philibert und Raynaud (50), Rao et al. (61), sowie Kontula et al. (66) an normalem Uterusgewebe und ferner einer breit angelegten Studie von Smith et al. (67), in der die mit Hilfe des Clauberg-Testes (68) gemessene biologische Gestagen-Aktivität natürlicher und synthetischer Steroide mit der Inhibitorwirkung gegenüber der ^3H -Progesteronbindung an Rezeptorproteine aus Humanmyometrium und Hühner-Eileiter verglichen wurde.

Unter diesem Aspekt erscheinen die Kompetitionsversuche als ein einfaches Modellsystem zur in-vitro-Testung der biologischen Aktivität synthetischer Steroide.

4. Die Assoziationskonstanten der progesteronbindenden Rezeptormoleküle aus Mammagewebe des Menschen lagen mit 0.51 bis $5.08 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ höher als der für CBG aus Humanserum von Westphal mit $7.0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ bestimmte Wert (48).
5. Während CBG bei Temperaturen zwischen 0 und 50°C ein gleichbleibend hohes Bindungsvermögen gegenüber ^3H -Progesteron aufwies, zeigte der cytoplasmatische Progesteronrezeptor ein deutliches Bindungsmaximum bei ca. 5°C und bei Anstieg der Temperatur über diesen Wert hinaus einen steilen Abfall seiner Bindungsfähigkeit.

Da die Steroidhormon-Rezeptorkomplexe einen direkten Effekt auf den durch den Zellkern kontrollierten Proteinsyntheseapparat ausüben, sind die zyklusabhängigen Konzentrationsschwankungen der cytoplasmatischen

progesteronbindenden Rezeptormoleküle im Mammagewebe des Menschen von besonderem Interesse. Die Verlaufskurve der Progesteron-Rezeptorkonzentrationen in Cytoplasmafraktionen normaler Mammagewebe von Frauen in der Prämenopause war durch niedrige Werte in der frühen Proliferationsphase, hohe Werte zum Zeitpunkt der Ovulation und einen Abfall zum Ende der Sekretionsphase charakterisiert. Bei der Wertung dieses Befundes darf nicht außer Acht gelassen werden, daß zur Konzentrationsbestimmung der cytoplasmatischen progesteronbindenden Steroidhormon-Rezeptorproteine die Charcoal-Dextran-Adsorptionstechnik in Verbindung mit einer Blockierung der unspezifisch bindenden Serumproteine durch einen exzessiv hohen Überschuß kalten Cortisols Verwendung fand, diese Methode aber in bezug auf den Progesteronrezeptor nur in begrenztem Umfang eine Diskriminierung gegenüber unspezifisch bindenden Serumproteinen zuläßt. Konzentrationsschwankungen der Steroidhormonrezeptoren während des Menstruationszyklus sind von mehreren Autoren am klassischen Zielorgan der Sexualhormone, dem Humanendometrium, untersucht worden. Für Östradiol sind die Angaben in der Literatur widersprüchlich. Robertson et al. (69) fanden die höchsten Östradiol-Rezeptorkonzentrationen im Humanendometrium zum Zeitpunkt der Ovulation, und Limpaphayom et al. (70) wiesen höhere Konzentrationen am 28. als am 8. Tag des Menstruationszyklus nach; dagegen führten Untersuchungen von Trams et al. (71) und Crocker et al. (58) zu Ergebnissen, die in guter Übereinstimmung mit Befunden stehen, die von Pollow et al. (72) erhoben wurden. Durch simultane Messung von intrazellulärer Östradiol-Rezeptorkonzentration und peripherem Östradiol-Serumspiegel konnten die genannten Autoren nachweisen, daß hohe Östradiol-Serumspiegel mit niedrigeren Rezeptor-

konzentrationen korrespondieren, daß also eine inverse Korrelation zwischen beiden Parametern besteht. Diese Tatsache führt zu der Vermutung, daß als grundsätzliche Ursache der Zyklusschwankungen cytoplasmatischer Steroidhormon-Rezeptorkonzentrationen meistechnische Probleme verantwortlich sind: In Abhängigkeit von der Höhe des Steroidhormon-Serumspiegels werden in unterschiedlichem Ausmaß die Rezeptor-Bindungsbezirke durch endogene Steroidhormone blockiert, sind also im Rahmen der Steroidhormon-Rezeptorbestimmung für ^3H -markierte Hormone nicht zugänglich.

In diesem Zusammenhang muß die Frage gestellt werden, ob es erlaubt ist, von der peripheren Steroidhormon-Serumkonzentration unmittelbar auf den intrazellulären Gehalt an Steroidhormonen im Erfolgsorgan zu schließen, oder ob nicht vielmehr angenommen werden muß, daß die zwischengeschaltete Zellmembran als regulierendes Filter den Steroidhormon-Einstrom in die Erfolgsorganzelle zu steuern vermag. Diese Frage wird erst endgültig beantwortet werden können, wenn es gelingt, mit Zellkulturen reiner Zellstämme zu arbeiten und wenn Techniken vorliegen, die eine exakte Serumkontaminations-freie Bestimmung der intrazellulären Steroidhormon-Konzentration ermöglichen. Betrachtet man die Progesteron-Rezeptorkonzentrationsschwankungen im normalen Mammagewebe des Menschen unter diesem Blickwinkel, stellt sich die Frage, ob für den Progesteronrezeptor zumindest ein zweiter Mechanismus angenommen werden muß, da, wie die vorliegende Arbeit und die Untersuchungen von Haukkamaa und Luukkainen (73), sowie Bayard et al. (74) an Humanendometrium zeigen konnten, ein gleichsinniger Verlauf von endogenem Progesteron-Serumspiegel und intrazellulärer Rezeptorkonzentration beobachtet werden konnte: Hohe Progesteron-Rezeptor-

konzentrationen (zum Zeitpunkt der Ovulation) korrelieren mit bekanntlich hohen Progesteron-Serumspiegeln der frühen Sekretionsphase..

Interessant erscheint in diesem Zusammenhang ein Hinweis auf die Untersuchungen von Prechtel und Rudzki (75), die anhand von 83 Mamma-Probeexzisionen bei Prämenopause-Patientinnen histometrisch und histomorphologisch zyklusabhängige Gewebeveränderungen am Milchdrüsenkörper nachweisen konnten. Dabei fielen vor allem die optimale, progesteronabhängige Läppchenentwicklung in der Sekretionsphase und die teilweise stattfindende Rückbildung in der frühen Proliferationsphase (niedriger Progesteronspiegel) auf.

Die Frage nach den Ursachen der Progesteron-Rezeptor-Konzentrationsschwankungen in der Cytoplasmafraktion normalen Mammagewebes des Menschen kann erst abschließend beantwortet werden, wenn die ursächlichen Faktoren aufgedeckt sind, die induzierend oder blockierend auf die Steroidhormon-Rezeptor-Bindungsaktivität oder in die Steroidhormon-Rezeptor-de-novo-Synthese eingreifen. Eine Reihe experimenteller Daten läßt vermuten, daß Östradiol, bzw. der Östradiol-Rezeptormechanismus, regulierend auf den Progesteronrezeptor wirkt (76). Darüber hinaus werden die am Uterus oder an der Mamma angreifenden Proteohormone für die Regulierung der Steroidhormon-Rezeptoraktivität, bzw. -konzentration, verantwortlich gemacht.

Der unmittelbare Vergleich der Progesteron-Rezeptorkonzentration in Mamma-Karzinomgewebe und normalem Mammagewebe, das in jedem Fall der selben tumortragenden Brust entnommen worden war, zeigte, daß der Progesteron-Rezeptorgehalt im Tumorgewebe

unter dem des Normalgewebes lag. In fünf Fällen waren Progesteronrezeptoren im Karzinomgewebe nicht nachweisbar. Diese Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen von Horwitz und McGuire (49), die nur in 11 von 33 untersuchten Mamma-Karzinomen des Menschen Progesteronrezeptoren nachweisen konnten. Eine Korrelation zwischen Tumortyp und Progesteron-Rezeptorgehalt war nicht verifizierbar. Die Schwierigkeit der Interpretation des niedrigen Progesteron-Rezeptorgehaltes im Tumorgewebe, verglichen mit Normalgewebe, liegt in der Tatsache begründet, daß Karzinome nicht aus einheitlichen Zellrassen gleichen Differenzierungsgrades bestehen, sondern in der Regel ein Konglomerat verschieden differenzierter Tumorzellen darstellen. Insofern ist der "niedrige Progesteron-Rezeptorgehalt des Tumorgewebes" Ausdruck eines Durchschnittswertes und nicht korrelierbar mit einem definierten Differenzierungsgrad der einzelnen Tumorzelle. Um derartige Korrelationen zu finden, wäre es erforderlich, einzelne Karzinomzellen zu isolieren, in Kulturmedien zu züchten und in der einheitlichen Zellrasse die Progesteron-Rezeptorkonzentration zu bestimmen. Die uns heute verfügbaren methodischen Möglichkeiten reichen nicht aus, diesen Weg zu beschreiten.

Aus den vorliegenden Befunden kann als sicher angenommen werden, daß die Karzinomzelle durch den Verlust eines Teiles der Progesteronrezeptoren eine Paralyisierung gegenüber Progesteron erfährt. So kann die Karzinomzelle, die die gesamte oder einen Teil der normalen Progesteron-Rezeptorpopulation verloren hat, nicht mehr in Wachstum und Funktion wie eine

normale Zelle durch die hormonale Umgebung reguliert werden. Die Zelle wird also vom zirkulierenden Progesteron nicht länger als Zelle eines Erfolgsorgans dieses Hormons erkannt, und eine endokrine Kontrolle (z.B. Mitoseblockierung durch Progesteron) ist somit hinfällig geworden.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist es nicht möglich, zu entscheiden, ob der im Karzinomgewebe beobachtete "Progesteron-Rezeptordefekt" als Folge einer Somatomutation im Struktur-Gen, das das Codewort für die Synthese spezifischen Progesteron-Rezeptorproteins enthält, aufzufassen ist, oder ob der Defekt durch Blockierung der Transkriptionsprozesse an diesem Struktur-Gen über einen entgleisten Regulationsmechanismus zustande kommt.

Darüber hinaus muß die Frage offen bleiben, ob der in den Karzinomzellen beobachtete niedrige Progesteron-Rezeptorspiegel als ursächlicher Faktor für die Karzinomentstehung in Frage kommt. Zumindest Prolactin als Proteohormon und Östradiol als das am Mamma-Karzinom des Menschen am besten untersuchte Steroidhormon werden als Kofaktoren des Karzinomätiologie des Mamma-Karzinoms des Menschen diskutiert (44).

Um diese Fragen abschließend beantworten zu können, stellt sich für die Zukunft die Aufgabe, an einer großen Fallzahl den endogenen Progesteron-Rezeptorgehalt im Tumorgewebe mit der Remissionsrate und dem eingeschlagenen Therapieweg (endokrine Therapie, chirurgische Maßnahmen, Zytostatika, Strahlenbehandlung) in einer breit angelegten klinischen Studie zu korrelieren.

Ferner ist es notwendig, auf experimentellem Wege zu eruieren, ob der generelle Steroidhormon-Wirkungsmechanismus in normalem und neoplastisch verändertem Gewebe identisch ist. Dazu gehören schließlich nicht nur der Nachweis cytoplasmatischer Steroidhormon-bindender Rezeptoren, sondern auch der Translokationsmechanismus, die Intaktheit des Chromatin-Akzeptorbezirks und die nachgeschalteten Transkriptions- und Translationsprozesse.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Cytoplasma aus Mammagewebe des Menschen spezifisch progesteronbindende Rezeptorproteine nachzuweisen und zu charakterisieren. Mit säulenchromatographischen Trennverfahren, isoelektrischer Fokussierung, Dichtegradienten-Zentrifugation, Kompetitionsstudien, Untersuchungen des Temperaturverhaltens und kinetischen Untersuchungen wurde eine Reihe des Progesteron-Rezeptorprotein kennzeichnender biochemischer Parameter ermittelt. Hier seien die wichtigsten Erkenntnisse kurz aufgeführt:

1. Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation:

Unter Zusatz von KCl sedimentierte der ^3H -Progesteron-Rezeptorkomplex im 4 S-Bereich, im salzfreien Puffermilieu dagegen im 4 S- und 8 S-Bereich.

2. Isoelektrische Fokussierung:

Der isoelektrische Punkt des ^3H -Progesteron-Rezeptorkomplexes lag bei pH 5.0 .

3. Kompetitionsstudien:

Nur gestagen-wirksame Steroidhormone waren geeignet, Progesteron kompetitiv aus dem Bindungsbezirk des Rezeptormoleküls zu verdrängen.

4. Temperatureinfluß:

Der cytoplasmatische Progesteronrezeptor unterscheidet sich mit seinem Bindungsmaximum bei ca. 5°C und dem bei steigenden Temperaturen steilen Abfall des Bindungsvermögens deutlich von Serum-Transportproteinen, die zwischen 0 und 50°C gleichbleibend hohe Bindungseigenschaften gegenüber ^3H -Progesteron zeigen.

Anschließend wurde versucht, Korrelationen zwischen endokrinem Status (Stadium des Menstruationszyklus) und intrazellulärer Progesteron-Rezeptorkonzentration zu finden. Niedrige Werte in der Proliferationsphase, hohe Werte zum Zeitpunkt der Ovulation und ein Abfall der Rezeptorkonzentration zum Ende der Sekretionsphase zeigen den gleichsinnigen Verlauf des endogenen Progesteron-Serumspiegels und der intrazellulären Rezeptorkonzentration auf.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, einen Vergleich zwischen dem Progesteron-Rezeptorgehalt der Normalzelle und der neoplastisch veränderten Zelle der selben Brustdrüse vorzunehmen. Die Konzentration progesteronbindender cytoplasmatischer Rezeptorproteine im Tumorgewebe lag in der Regel unter der des Normalgewebes. In fünf Fällen waren Progesteronrezeptoren im Karzinomgewebe nicht nachweisbar. Eine Korrelation zwischen Tumortyp und Rezeptorgehalt war nicht verifizierbar.

Aufgrund der vorliegenden Befunde kann als sicher angenommen werden, daß die Karzinomzelle die gesamte oder einen Teil ihrer Progesteron-Rezeptorpopulation verliert und dadurch in Wachstum und Funktion nicht mehr wie eine normale Zelle der endokrinen Kontrolle durch ihre hormonale Umgebung unterliegt.

Die pathophysiologische Bedeutung dieser Zusammenhänge wird diskutiert.

VI

L I T E R A T U R

1. TURKINGTON, R.W.:
(1972) In: Biochemical Actions of Hormones, Vol.2,
Hsg. Litwack, G. (Academic Press, New York), 57-61
2. TURKINGTON, R.W.:
(1968a) Endocrinology 82, 540
3. TURKINGTON, R.W. und TOPPER, Y.J.:
(1967) Endocrinology 80, 329
4. STOCKDALE, F.E. und TOPPER, Y.J.:
(1966) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 56, 1283
5. RIVERA, E.M. und BERN, R.A.:
(1961) Endocrinology 69, 340
6. RIVERA, E.M.:
(1964) Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 116, 568
7. STOCKDALE, F.E., JUERGENS, W.G. und TOPPER, Y.J.:
(1966) Develop. Biol. 13, 266
8. BAIRD, T.:
(1968) J. Clin. Endocrinol. Metab. 28, 244
9. KORENMAN, S.G., PERRIN, L.E. und McCALLUM, T.P.:
(1969) J. Clin. Endocrinol. Metab. 29, 879
10. TURKINGTON, R.W. und HILF, R.:
(1968) Science 160, 1457
11. TURKINGTON, R.W.:
(1971b) In: Developmental Aspects of the Cell
Cycle, Hsg. Cameron, I.L., Padilla, G.M. und
Zimmermann, A.M. (Academic Press, New York), 315
12. SCHMIDT-MATTHIESEN, H.:
(1963) Das normale menschliche Endometrium
(Thieme Verlag, Stuttgart)

13. CHATTERTON, R.T., Jr.:
(1971) In: Sex Steroids: Molecular Mechanisms,
Hsg. McKerns, K.W. (Appleton, New York)
14. CHATTERTON, R.T., Jr., CHATTERTON, A.J. und
HELLMAN, L.:
(1969) Endocrinology 85, 16
15. PROP, F.J.A.:
(1959) Nature 184, 379
16. PROP, F.J.A.:
(1960) Exp. Cell Res. 20, 256
17. PROP, F.J.A.:
(1961) Pathol. Biol. Semaine Hop. 9, 640
18. PROP, F.J.A.:
(1966) Exptl. Cell Res. 42, 386
19. BUTCHER, R.W., ROBISON, G.A. und SUTHERLAND, E.W.:
(1972) In: Biochemical Actions of Hormones, Vol. 2,
Hsg. Litwack, G. (Academic Press, New York), 30
20. HOSKINS, D.D. und CASILLAS, E.R.:
(1975) Hormones, Second Messengers, and the
Mammalian Spermatozoon; In: Molecular Mechanisms
of Gonadal Hormone Action, Vol.1, Hsg. Thomas, J.A.
und Singhal, R.L. (HM+M Medical and Scientific
Publishers, Aylesbury, Bucks, England), 305
21. SUTHERLAND, E.W.:
(1972) Science 177, 401
22. KREBS, E.G.:
(1972) In: Current Topics in Cellular Regulation,
Vol.5, Hsg. Horecker, B.L. und Stadtman, E.R.
(Academic Press, New York), 99
23. ROBISON, G.A., BUTCHER, R.W. und SUTHERLAND, E.W.:
(1971) Cyclic AMP (Academic Press, New York)

24. WALSH, D.A. et al.:
(1972) In: Advances in Cyclic Nucleotide Research, Vol.1, Hsg. Greengard, P., Robison, G.A. und Paoletti, R. (Raven Press, New York), 33
25. SUTHERLAND, E.W., RALL, T.W. und MENON, T.:
(1962) J. Biol. Chem. 237, 1220
26. ØYE, I. und SUTHERLAND, E.W.:
(1966) Biochim. Biophys. Acta 127, 347
27. JENSEN, E.V. und JACOBSON, H.T.:
(1962) Rec. Prog. Horm. Res. 18, 387
28. JAILKHANI, B.L. und TALWAR, G.P.:
(1975) The Role of Estrogens in Differentiation and Growth of Target Tissues; In: Molecular Mechanisms of Gonadal Hormone Action, Vol.1, Hsg. Thomas, J.A. und Singhal, R.L. (HM+M Medical and Scientific Publishers, Aylesbury, Bucks, England), 381
29. TALWAR, G.P., SHARMA, S.K. und GUPTA, S.L.:
(1968a) J. Sci. Ind. Res. 27, 27
30. TALWAR, G.P., SOPORI, M.L., BISWAS, D.K. und SEGAL, S.J.:
(1968b) Biochem. J. 107, 765
31. TALWAR, G.P., SEGAL, S.J., EVANS, A. und DAVIDSON, O.W.:
(1964) Proc. Natn. Acad. Sci. USA 52, 1059
32. STUMPF, W.E.:
(1969) Endocrinology 85, 31
33. JENSEN, E.V.:
(1965) Proceedings of 2nd International Congress on Endocrinology (Excerpta Medica, New York, International Congress Series No.83), 420
34. KING, R.J.B. und GORDON, J.:
(1966) J. Endocr. 34, 431

35. BRECHER, P.J., VIGERSKY, R., WOTIZ, H.S. und WOTIZ, H.H.:
(1967) Steroids 10, 635
36. JENSEN, E.V., SUZUKI, T., KWASHIMA, T., STUMPF, W.E., JUNGBLUT, P.W. und DE SOMBRE, E.R.:
(1968) Proc. Natn. Acad. Sci. USA 59, 632
37. SHYAMALA, G. und GORSKI, J.:
(1969) J. Biol. Chem. 244, 1097
38. JENSEN, E.V., HURST, D.J., DE SOMBRE, E.R. und JUNGBLUT, D.W.:
(1967) Science 158, 385
39. JENSEN, E.V., SUZUKI, T., NUMUTA, M., SMITH, S. und DE SOMBRE, E.R.:
(1969) Steroids 13, 417
40. PUCA, G.A. und BRESCIANI, F.:
(1969) Nature (Lond.) 223, 745
41. KING, R.J.B., GORDON, J. und STEGGLES, A.W.:
(1969) Biochem. J. 114, 649
42. KING, R.J.B. und GORDON, J.:
(1972) Nature New Biol. 240, 185
43. McGUIRE, W.L., CARBONE, P.P., SEARS, M.E. und ESCHER, G.C.:
(1975) In: Estrogen Receptors in Human Breast Cancer (Raven Press, New York), 3
44. McGUIRE, W.L., CARBONE, P.P. und VOLLMER, E.P.:
(1975) Estrogen Receptors in Human Breast Cancer (Raven Press, New York)
45. HILF, R. und WITTLIFF, J.L.:
(1974) In: Hormones and Cancer, Hsg. McKerns, K.W. (Academic Press, New York), 104
46. BULBROOK, R.D.:
(1970) Advan. Steroid Biochem. Pharmacol. 1, 387

47. HAYWARD, J.L. und BULBROOK, R.D.:
(1968) In: Prognostic Factors in Breast Cancer,
Hsg. Forrest, A.P.M. und Kunkler, P.B.
(Livingstone, Edinburgh), 383
48. WESTPHAL, U.:
(1971) Steroid-Protein Interactions
(Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York)
49. HORWITZ, K.B. und McGUIRE, W.L.:
(1975) Steroids 25, 497
50. PHILIBERT, D. und RAYNAUD, J.-P.:
(1973) Steroids 22, 89
51. NOYES, R.W., HERTIG, A.T. und ROCK, R.:
(1950) Dating the endometrial biopsy. Fertil and
Steril. 1, 3
52. DAVIES, J.:
(1973) The Measurement of Cytoplasmatic Steroid
"Receptor" Proteins; In: Molecular Techniques
and Approaches in Developmental Biology,
Hsg. Chrispeels, M.J.
(John Wiley & Sons, New York), 39
53. SCATCHARD, G.:
(1949) The attractions of Proteins for small
molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660
54. VESTERBERG, O und SVENSSON, H.:
(1966) Acta Chem. Scand. 20, 820
55. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. und
RANDALL, R.J.:
(1951) J. Biol. Chem. 193, 265
56. McGUIRE, J.L., BARISO, D.C., FULLER, B.S.,
McELRATH, T.G. und DELAHUNTE, J.M.:
(1972) J. Clin. Endocrinol. 34, 243
57. NOTIDES, A.C., HAMILTON, D.E. und RUDOLPH, J.H.:
(1972) Biochim. Biophys. Acta 271, 214

58. CROCKER, S.G., MILTON, P.J.D. und KING, R.J.B.:
(1974) J. Endocrinol. 62, 145
59. KRISHNAN, A.R., HINGORANI, V. und LAUMAS, K.R.:
(1973) Acta endocr. (Kbh.) 74, 756
60. VERMA, U. und LAUMAS, K.R.:
(1973) Biochim. Biophys. Acta 317, 403
61. RAO, B.R., WIEST, W.G. und ALLEN, W.M.:
(1974) Endocrinology 95, 1275
62. YOUNG, P.C.M. und CLEARY, R.E.:
(1974) J. Clin. Endocrinol. Metab. 39, 425
63. McGUIRE, J.L., BARISO, C.D. und FULLER, B.S.:
(1974) Acta endocr. (Kbh.) 75, 579
64. KONTULA, K., JÄNNE, O., VIHKO, R., DE JAGER, E.,
DE VISSER, J. und ZEELEN, F.:
(1975) Acta endocr. (Kbh.) 78, 574
65. SCHRADER, W.T. und O'MALLEY, B.W.:
(1972) J. Biol. Chem. 247, 51
66. KONTULA, K., JÄNNE, O., LUUKKAINEN, T. und
VIHKO, R.:
(1973) Biochim. Biophys. Acta 328, 145
67. SMITH, H.E., SMITH, R.G., TOFT, D.O.,
NEERGÅRD, J.R., BURROWS, E.P. und O'MALLEY, B.W.:
(1974) J. Biol. Chem. 249, 5924
68. CLAUBERG, C.:
(1930) Klin. Wschr. 9, 2004
69. ROBERTSON, D.M., MESTER, J., BEILBY, J.,
STEELE, S.J. und KELLIE, A.E.:
(1971) Acta endocr. (Kbh.) 68, 534
70. LIMPAPHAYOM, K., LEE, C., JACOBSON, H.I. und
KING, T.M.:
(1971) Amer. J. Obstet. Gynec. 111, 1064

71. TRAMS, G., ENGEL, B., LEHMANN, F. und MAAS, H.:
(1973) *Acta endocr. (Kbh.)* 72, 351
72. POLLOW, K., LÜBBERT, H., BOQUOI, E.,
KREUZER, G. und POLLOW, B.:
(1975) *Endocrinology* 96, 319
73. HAUKKAMAA, M. und LUUKKAINEN, T.:
(1974) *J. Steroid Biochem.* 5, 447
74. BAYARD, F., DAMILANO, S., ROBEL, P. und
BAULIEU, E.-E.:
(1975) *C.R. Acad. Sc. Paris*, t.281, 1341
75. PRECHTEL, K. und RUDZKI, G.:
(1973) *Geburtsh. u. Frauenheilk.* 33, 370
76. O'MALLEY, B.W. und MEANS, A.R.:
(1974) *Effects of Female Steroid Hormones on
Target Cell Nuclei; In: The Cell Nucleus, Vol.3,*
Hsg. Busch, H. (Academic Press, N.Y. u. Lond.), 379

VII

L E B E N S L A U F .

- 18.2.1950 als Sohn des Oberingenieurs Günther
Sinnecker und seiner Ehefrau Ilse,
geb. Spreemann, in Berlin-Spandau
geboren
- 4.2.1969 Reifeprüfung an der Carl-Friedrich-
von-Siemens-Oberschule (neusprachli-
ches Gymnasium) in Berlin-Siemensstadt
- SS 1970 Beginn des Medizinstudiums an der
Freien Universität Berlin
- 20.2.1976 Staatsexamen an der FU Berlin
- April 1973-
April 1976 Anfertigung der Dissertation als
Doktorand im Institut für Molekular-
biologie und Biochemie der
Freien Universität Berlin
- 1.4.1976 Beginn der Tätigkeit als Medizinal-
assistent am Institut für Molekular-
biologie und Biochemie der FU Berlin
- 23.4.1976 Heirat

